

ПОВЫШЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ИММУНОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА АЛЬФА-ФЕТОПРОТЕИНА С ПОМОЩЬЮ ПЛАЗМОННЫХ СЕРЕБРЯНЫХ НАНОЧАСТИЦ

Разработан вариант тест-системы, основанной на эффекте плазмонного усиления флуоресценции, для анализа низких концентраций онкомаркера альфа-фетопротеина (АФП). Реакция антиген – антитело проводилась на покрытых серебряными наночастицами полистирольных планшетах, что давало выигрыш в чувствительности флуоресцентного иммунологического анализа и улучшало соотношение «сигнал – шум» по сравнению с аналогичными системами в отсутствие серебряных наночастиц. Преимуществами данного теста, по сравнению с широко используемым в настоящее время методом ELISA и другими методами, являются малые объемы пробы, быстрота и простота реализации. В основе тестовой системы лежит layer-by-layer-принцип сборки элементов, светодиодное возбуждение флуоресценции и система регистрации флуоресцентного сигнала на уровне 1 нВт. Предложенная тест-система позволяет обнаруживать АФП при концентрациях, имеющих место в реальной клинической практике. Обнаружена зависимость усиления флуоресценции меченых антител АФП от концентрации меченых антител в присутствии серебряных наночастиц. Максимальное усиление флуоресценции меченых антител АФП составило 6 раз.

Ключевые слова: плазмоника; флуоресценция; наночастицы серебра; изотиоцианат флуоресцеина; полиэлектролит; флуоресцентный иммунологический анализ; альфа-фетопротеин.

A test system is proposed based on metal enhanced fluorescence to analyze low concentrations of alpha-fetoprotein (AFP), a tumor marker. Antigen-antibody reaction was performed on polystyrene plates coated with silver nanoparticles to increase sensitivity of fluorescent immunoassay and signal-to-noise ratio as compared to silver-free system. As compared to widely used ELISA technique and other immunoassay techniques the proposed approach is characterized by smaller probe volume, fast analysis and simplicity. The proposed test system uses layer-by-layer assembly approach, LED excitation and nanowatt photodetection set-up. The proposed test system offers AFP detection at concentrations used in clinical practice. Fluorescence enhancement for labeled AFP antibodies on a silver substrate was found to depend on antibodies concentration and was up to 6 times.

Key words: plasmonics; fluorescence; silver nanoparticles; fluorescein isothiocyanate; polyelectrolyte; fluorescent immunoassay; alpha-fetoprotein.

В последние годы значительное внимание исследователей во всем мире уделяется разработке биофизических методов для высокочувствительного количественного обнаружения биомолекул и их взаимодействий между собой. В частности, высокая востребованность со стороны таких отраслей, как фармацевтическая промышленность, медицинская диагностика, экологический мониторинг и другие, стимулирует разработку точных и быстродействующих методов обнаружения белковых молекул в биологических образцах сложного состава (кровь, сыворотка, слюна, молоко и т. д.). Такого рода разработки требуют междисциплинарного подхода и чрезвычайно важны, поскольку могут использоваться для решения широкого круга научных и прикладных задач.

Одним из основных методов детектирования биомолекул является иммунологический анализ (immunoassay). Качество и эффективность иммунологического анализа определяются применяемыми метками и методами их детектирования. Например, для флуоресцентных меток чувствительность и динамический диапазон в среднем на 1–2 порядка выше, чем при использовании фотометрических меток [1]. В свою очередь, одним из перспективных способов повышения чувствительности флуоресцентного иммунологического анализа является плазмонно-усиленная флуоресценция. В зависимости от начального квантового выхода флуоресценции используемой флуоресцентной метки (флуорофора) интенсивность регистрируемого сигнала может быть повышена в 10–100 раз при помещении флуорофора вблизи металлических наночастиц, как правило, золота или серебра [2, 3]. Увеличение интенсивности флуоресценции обусловлено преобладанием усиливающих факторов над ослабляющими. Усиление происходит за счет концентрации электромагнитного излучения падающей световой волны вблизи наночастиц, а также увеличения скорости спонтанных переходов, ослабление – за счет тушения флуоресценции

вблизи поверхности металла [4, 5]. В последние годы было опубликовано значительное количество работ, направленных на практическую реализацию эффекта плазмонного усиления флуоресценции в иммунологических анализах [6–14].

Ранее авторами была продемонстрирована возможность получения усиленной флуоресценции для модельных биомолекул BSA-FITC (бычье-сывороточного альбумина, меченного флуоресцеином изотиоцианатом FITC) [12, 15, 16] и IgG-FITC (иммуноглобулина человека, меченного FITC) [17], осажденных на нанотекстурированную серебряную поверхность. Было показано, что оптимальный размер наночастиц серебра для получения максимального усиления флуоресценции молекул, меченных FITC, составляет около 50 нм, и оптимальное расстояние между флуорофором и металлом должно быть равным нескольким нанометрам [15]. В указанной работе исследовалось применение эффекта плазмонно-усиленной флуоресценции для детектирования альфа-фетопротеина с помощью антител к АФП, меченных FITC. АФП является специфическим онкомаркером на наличие рака печени и некоторых опухолей репродуктивной системы. Обнаружение низких концентраций АФП в крови важно для диагностики и оценки эффективности лечения данных заболеваний. К настоящему времени нам известно всего несколько работ по применению плазмоники в иммунологическом анализе АФП: с применением поверхностного плазмонного резонанса [18] либо усиленной флуоресценции [19–22]. В этих работах использовалось лазерное возбуждение через призму нарушенного полного внутреннего отражения или через обкладочный слой оптоволокна. Для широкого применения в массовой аналитической спектроскопии эти подходы следует признать достаточно дорогостоящими, так как требуются сложные измерительное оборудование и пробоподготовка.

Цель настоящей работы – оценка возможности детектирования низких концентраций АФП с помощью простой тест-системы на основе иммунологического анализа с применением плазмонно-усиленной флуоресценции. При этом одной из поставленных задач было максимальное упрощение процедуры изготовления тест-систем и системы регистрации флуоресцентного сигнала. В связи с этим были исключены все дорогостоящие процессы получения металлических пленок (нанолитография, молекулярно-лучевая эпитаксия, химическое травление, вакуумное осаждение), а для возбуждения флуоресценции вместо лазера использовался светодиод. Наночастицы серебра электростатически осаждались на поверхность лунок полистирольных планшетов, широко используемых в иммунологическом анализе, с помощью полиэлектролитных слоев. Все остальные процессы, кроме реакции антиген – антитело, также были основаны на методе электростатического осаждения.

Материалы и методы исследований

В работе использовались следующие химические реактивы: нитрат серебра, цитрат натрия, полиэлектролит полидиаллилдиметиламмоний хлорид (ПДАДМАХ), хлорид натрия (все реактивы – производства компании Sigma Aldrich), флуоресцеин изотиоцианат (изомер I, Sigma), буферный раствор Tris-EDTA (pH = 7,6, Fisher BioReagents), BSA (98 %, Aldrich), АФП в лиофилизированной форме (Abcam). В качестве подложек использовались прозрачные 96-луночные полистирольные планшеты (Sarstedt) с объемом лунки 380 мкл.

Золь серебра был синтезирован по методу цитратного восстановления нитрата серебра [23]. Растворили 9 мг нитрата серебра в 50 мл воды, затем раствор доводился до кипения. В кипящий раствор добавлялся 1 мл 1 % цитрата натрия. Реакция прерывалась через 20 мин кипячения раствора при образовании золя серебра оранжево-коричневого цвета.

Процедура осаждения серебряных наночастиц в лунки планшета была следующей:

- 1) 200 мкл раствора ПДАДМАХ (1 г/л в 0,5 моль/л хлорида натрия) выдерживались в половине лунок планшета в течение 20 мин;
- 2) 200 мкл золя серебра выдерживались в половине лунок планшета в течение 24 ч при комнатной температуре;
- 3) 200 мкл раствора ПДАДМАХ (1 г/л в 0,5 моль/л хлорида натрия) выдерживались во всех лунках планшета в течение 20 мин.

Каждый этап процедуры заканчивался промывкой дистиллированной водой.

Синтез конъюгатов антител к АФП (antiAFP) и FITC (далее – antiAFP-FITC) проводился по стандартной методике [24], концентрация исходного раствора была 2,97 мг/мл с молярным отношением antiAFP : FITC 1 : 3,9. Рабочие растворы antiAFP-FITC с концентрациями 0,5–40 мкг/мл получали путем разбавления исходного раствора буфером Tris-EDTA.

Для исследования усиленной флуоресценции меченых антител antiAFP-FITC в металлизированные и неметаллизированные лунки планшета добавлялось по 100 мкл раствора antiAFP-FITC разных концентраций и выдерживалось в течение 40 мин при комнатной температуре. Для удаления несвязавшихся антител лунки дважды промывались буфером Tris-EDTA.

Формирование комплексов «антиген – антитело AFP*antiAFP-FITC» проводилось в лунках планшета по следующей процедуре:

1) 100 мкл рабочего раствора АФП (0,005–40 мкг/мл) выдерживались в металлизированных и неметаллизированных лунках планшета в течение 40 мин;

2) для блокирования несвязавшихся центров на поверхности в лунки добавлялось 100 мкл 1 % раствора BSA и выдерживалось в течение 20 мин;

3) 100 мкл раствора antiAFP-FITC (10 мкг/мл) добавлялось в каждую лунку и выдерживалось в течение 1 ч для иммунной реакции.

Каждый этап процедуры заканчивался промывкой буфером Tris-EDTA.

Оптическая плотность образцов измерялась на спектрофотометре Cary-500 (Varian). Спектры флуоресценции измерялись на дифракционном спектрометре S-3801 (Solar TII) с дифракционной решеткой 150 штр./мм и ПЗС-матрицей LN-CCD-1152-E PROD FG (Princeton Instruments), охлаждаемой жидким азотом, в качестве детектора. Светодиод ARPL-3W Blue (Arlight) с максимумом в спектре испускания на длине волны 460 нм и спектральной полушириной 25 нм использовался в качестве источника возбуждения флуоресценции. Возбуждение и регистрация флуоресценции проводились по нормали к образцу через объектив микроскопа Olympus LMPlanFl. Возбуждающее излучение в канале регистрации отрезалось с помощью светофильтра ЖС18.

Результаты исследований и их обсуждение

По данным электронной микроскопии наночастиц серебра [15] и атомно-силовой микроскопии (не представлено здесь), поверхность серебряных пленок, полученных осаждением наночастиц серебра на ПДАДМАХ-модифицированную полистирольную подложку, представляет собой сплошной слой сферических наночастиц размером 30–80 нм. В спектре оптической плотности посеребренных лунок планшета (рис. 1, кривая 1) наблюдается характерный максимум в области 400 нм, связанный с резонансным плазмонным поглощением наночастицами серебра, а также широкая полоса в области 600–800 нм, связанная с поглощением агрегатами серебряных наночастиц. Известно [25], что агрегация наночастиц приводит к большей концентрации электромагнитного излучения падающей световой волны по сравнению с одиночными наночастицами, что является благоприятным фактором для получения больших значений усиления флуоресценции.

Перекрытие полосы плазмонного резонанса серебряной пленки со спектром поглощения antiAFP-FITC (antiAFP не поглощает в видимой области спектра, поглощение обусловлено только поглощением FITC) обеспечивает эффективное возбуждение флуоресценции FITC и создает условия для наблюдения усиленной флуоресценции [26, 27].

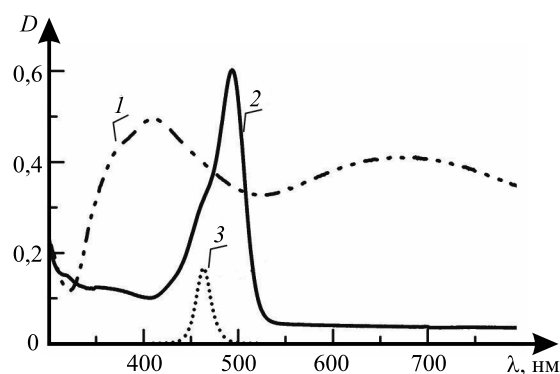


Рис. 1. Спектры оптической плотности: 1 – покрытых наночастицами серебра полистирольных лунок планшета; 2 – раствора antiAFP-FITC; 3 – спектр излучения светодиода, возбуждающего флуоресценцию FITC (в относительных единицах)

Ранее нами для модельной системы «BSA-FITC на поверхности пленки серебряных наночастиц» было установлено [12, 15, 16], что максимальное усиление флуоресценции наблюдается при расстоянии между биомолекулами и наночастицами серебра, соответствующем 1–3 полиэлектролитным слоям (1,4–3,3 нм [28]). Поэтому в указанной работе antiAFP-FITC адсорбировалось на минимально возможный по данной методике один слой полиэлектролита ПДАДМАХ, принимая во внимание дальнейшую необходимость формирования комплекса «антиген – антитело AFP*antiAFP-FITC», что должно было привести к увеличению расстояния между наночастицами серебра и флуоресцентными метками.

Усиление флуоресценции для меченых антител antiAFP-FITC

Для изучения возможности использования металлизированных планшетов в количественном флуоресцентном иммунологическом анализе АФП сразу необходимо было изучить зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации antiAFP-FITC (рис. 2). Фактор усиления флуорес-

ценции (показан на вставке рис. 2) рассчитывался как отношение интенсивностей флуоресценции antiAFP-FITC для покрытых и не покрытых наночастицами серебра лунок при одинаковой концентрации раствора на длине волны максимума флуоресценции FITC (530 нм).

Для меченых антител antiAFP-FITC, адсорбированных на серебряных подложках, наблюдается увеличение интенсивности флуоресценции с ростом концентрации, в то время как интенсивность флуоресценции на контрольных пластиковых подложках выходит на насыщение. Вследствие чего наблюдается рост фактора усиления флуоресценции antiAFP-FITC на посеребренных подложках с увеличением концентрации antiAFP-FITC (см. вставку на рис. 2).

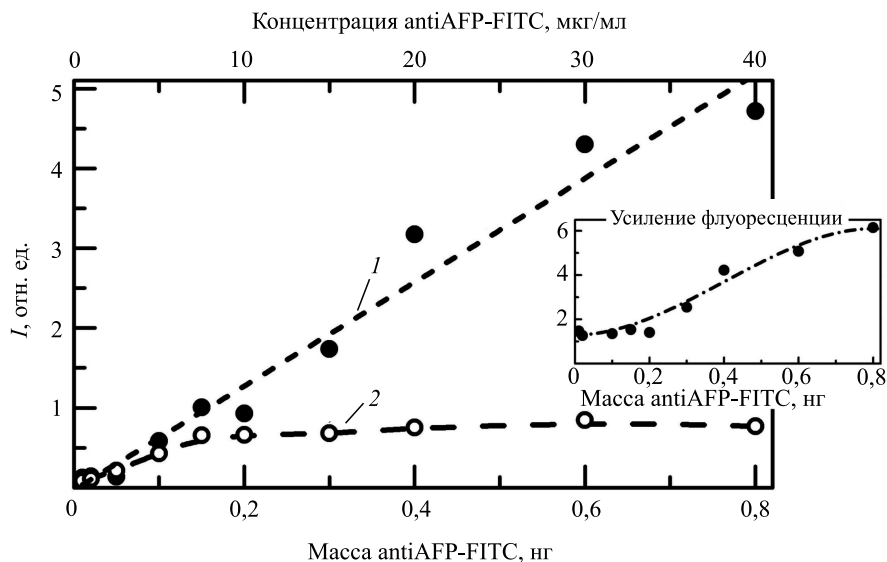


Рис. 2. Зависимость интенсивности флуоресценции antiAFP-FITC от массы (концентрации) antiAFP-FITC для лунок планшета: 1 – покрытых; 2 – не покрытых наночастицами серебра. На вставке показана аналогичная зависимость фактора усиления флуоресценции antiAFP-FITC

Подобная зависимость наблюдалась ранее [29] для модельной системы иммунологического анализа иммуноглобулина человека с использованием антител, меченных инфракрасной флуоресцентной меткой Cy5, и крупных серебряных наночастиц размером 149 нм. Более высокое значение фактора усиления флуоресценции для Cy5, вероятно, связано с более низким квантовым выходом флуоресценции Cy5 (0,28) по сравнению с FITC (0,92).

Важно отметить, что на посеребренных подложках не наблюдается концентрационного тушения флуоресценции FITC вследствие резонансного переноса энергии (Forster resonance energy transfer), характерного для меток на диэлектрических подложках. Подобный эффект «маскирования» концентрационного тушения вблизи поверхности серебра был описан ранее для молекул человеческого сывороточного альбумина (HSA), меченного FITC [13]. При увеличении числа меток, приходящихся на молекулу HSA, с 1 до 7 фактор усиления флуоресценции увеличивался в 4 раза.

Наличие выраженной зависимости между сигналом флуоресценции и концентрацией меченых антител для посеребренных лунок планшета позволяет построить калибровочные кривые и проводить количественный анализ в иммунологической тест-системе.

Следует отметить, что для представленной тест-системы основным параметром, определяющим чувствительность системы, является не концентрация раствора antiAFP-FITC, а адсорбированная на подложку масса меченого антитела. С учетом доли antiAFP-FITC, адсорбируемой на поверхность лунки планшета из раствора, и площади поверхности регистрации флуоресценции было определено, что предел обнаружения antiAFP-FITC составляет 0,03 нг. В представленном эксперименте измеренная мощность флуоресценции составляла около 0,4 нВт на 1 нг antiAFP-FITC, что делает возможным регистрацию подобного сигнала с помощью недорогих неохлаждаемых кремниевых детекторов.

Усиление флуоресценции для комплекса «антиген – антитело AFP*antiAFP-FITC»

Следующий этап – получение усиленного флуоресцентного сигнала для комплексов «антиген – антитело AFP*antiAFP-FITC» на поверхности посеребренных лунок планшета. Усиление флуоресценции сохраняется и для комплексов «AFP*antiAFP-FITC» (рис. 3).

Важно отметить, что максимальный фактор усиления флуоресценции для комплексов «AFP*antiAFP-FITC» равен 8, и он выше, чем в случае для меченых антител antiAFP-FITC при равных условиях. Вероятно, это связано с тем, что дополнительный слой молекул АФП и BSA улучшает условия наблюдения плазмонно-усиленной флуоресценции за счет увеличения расстояния между наночастицами серебра и флуорофором.

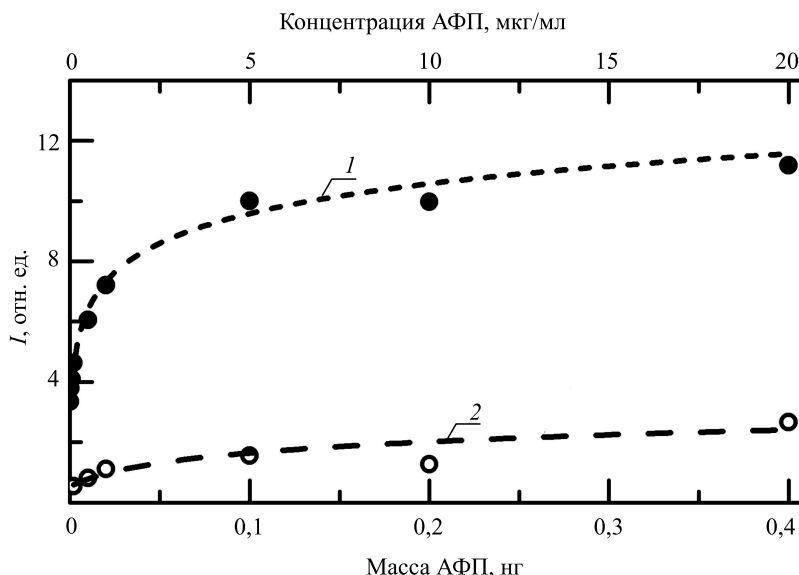


Рис. 3. Зависимость интенсивности флуоресценции комплексов «антиген – антитело AFP*antiAFP-FITC» от массы (концентрации) AFP для лунок планшета: 1 – покрытых; 2 – не покрытых наночастицами серебра

Как в случае меченых антител antiAFP-FITC, так и для комплексов «AFP*antiAFP-FITC» присутствие наночастиц серебра приводит к увеличению чувствительности метода и улучшению соотношения «сигнал – шум». Если для комплексов «AFP*antiAFP-FITC» в пластиковых лунках концентрацию АФП ниже 100 нг/мл было невозможно зарегистрировать, то для посеребренных лунок уровень флуоресцентного сигнала позволял обнаружить АФП при концентрации раствора 5 нг/мл. Абсолютное значение детектируемой массы АФП было менее 0,1 нг (см. рис. 3).

Концентрация АФП в плазме крови здорового человека составляет около 10 нг/мл, однако этот уровень существенно возрастает (до 1 мкг/мл и выше) при печеночно-клеточном раке или некоторых других видах рака [18, 30]. Таким образом, чувствительность предлагаемого метода прямого иммунологического анализа с применением плазмонно-усиленной флуоресценции находится на уровне, необходимом для клинической диагностики АФП. В то же время метод отличается легкостью приготовления образцов и позволяет использовать простую экспериментальную схему регистрации флуоресценции, что делает его перспективным с точки зрения создания недорогих тест-систем экспресс-анализа.

В работе продемонстрирована возможность количественного детектирования АФП массой менее 0,1 нг, соответствующей концентрациям раствора АФП, имеющим место в реальной клинической практике. При этом предложенную тест-систему, основанную на иммунологическом анализе и плазмонно-усиленной флуоресценции, отличают простота изготовления методами нанохимии и простота системы регистрации за счет применения светодиода для возбуждения флуоресценции.

Чувствительность детектирования с применением серебряных наночастиц была повышена для меченых антител antiAFP-FITC в 6 раз, для АФП – в 8 раз. Предел обнаружения antiAFP-FITC составил 0,03 нг. Детектируемый сигнал флуоресценции составлял около 0,4 нВт на 1 нг детектируемого вещества, что делает возможным регистрацию подобных сигналов с помощью недорогих кремниевых детекторов, не требующих охлаждения.

Представленные в работе результаты перспективны с точки зрения создания недорогих экспресс-систем иммунологического анализа с применением плазмонно-усиленной флуоресценции.

Авторы выражают благодарность С. Н. Гилевичу (Институт биоорганической химии НАН Беларуси) за приготовление меченых антител antiAFP-FITC. Работа выполнена в рамках Национальной программы «Конвергенция» и при финансовой поддержке ЗАО «Элта» (Россия).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Ozinskas A. J. Principles of Fluorescence Immunoassay // Topics in Fluorescence Spectroscopy. Vol. 4. Probe Design and Chemical Sensing : in 14 ch. New York, 1994. Ch. 14. P. 449–496.
2. Weitz D. A., Garoff S., Gersten J. I., Nitzan A. The enhancement of Raman scattering, resonance Raman scattering, and fluorescence from molecules adsorbed on a rough silver surface // J. Chem. Phys. 1983. Vol. 78, № 9. P. 5324–5338.
3. Kümmerlen J., Leitner A., Brunner H., Aussenegg F. R., Wokaun A. Enhanced dye fluorescence over silver island films: analysis of the distance dependence // Mol. Phys. 1993. Vol. 80, № 5. P. 1031–1046.
4. Gaponenko S. V. Introduction to Nanophotonics. Cambridge, 2010. P. 436–454.
5. Aslan K., Geddes C. Metal-Enhanced Fluorescence: Progress Towards a Unified Plasmon-Fluorophore Description // Metal-Enhanced Fluorescence : in 20 ch. Hoboken, 2010. Ch. 1. P. 1–23.

6. Attridge J. W., Daniels P. B., Deacon J. K., Robinson G. A., Davidson G. P. Sensitivity enhancement of optical immunosensors by the use of a surface plasmon resonance fluoroimmunoassay // *Biosens. Bioelectron.* 1991. Vol. 6, № 3. P. 201–214.
7. Yu F., Persson B., Löfås S., Knoll W. Surface plasmon fluorescence immunoassay of free prostate-specific antigen in human plasma at the femtomolar level // *Anal. Chem.* 2004. Vol. 76, № 22. P. 6765–6770.
8. Sokolov K., Chumanov G., Cotton T. M. Enhancement of molecular fluorescence near the surface of colloidal metal films // *Anal. Chem.* 1998. Vol. 70, № 18. P. 3898–3905.
9. Tabakman S. M., Lau L., Robinson J. T., Price J., Sherlock S. P., Wang H., Zhang B., Chen Z., Tangsombatvisit S., Jarrell J. A., Utz P. J., Dai H. Plasmonic substrates for multiplexed protein microarrays with femtomolar sensitivity and broad dynamic range // *Nat. Commun.* 2011. № 2. P. 466.
10. Zhou L., Ding F., Chen H., Ding W., Zhang W., Chou S. Y. Enhancement of immunoassay's fluorescence and detection sensitivity using three-dimensional plasmonic nano-antenna-dots array // *Anal. Chem.* 2012. Vol. 84, № 10. P. 4489–4495.
11. Zhang R., Wang Z., Song C., Yang J., Cui Y. A straightforward immunoassay applicable to a wide range of antibodies based on surface enhanced fluorescence // *J. Fluoresc.* 2013. Vol. 23, № 3. P. 551–559.
12. Kulakovich O., Strekal N., Artemyev M., Stupak S., Maskevich S., Gaponenko S. Improved method for fluorophore deposition atop a polyelectrolyte spacer for quantitative study of distance-dependent plasmon-assisted luminescence // *Nanotechnology.* 2006. Vol. 17, № 20. P. 5201–5206.
13. Lakowicz J. R., Malicka J., D'Auria S., Gryczynski I. Release of the self-quenching of fluorescence near silver metallic surfaces // *Anal. Biochem.* 2003. Vol. 320, № 1. P. 13–20.
14. Okuda K. Primary liver cancer // *Digest Dis. Sci.* 1986. Vol. 31, № 9. P. 133S–146S.
15. Guzatov D. V., Vaschenko S. V., Stankevich V. V., Lunevich A. Y., Glukhov Y. F., Gaponenko S. V. Plasmonic enhancement of molecular fluorescence near silver nanoparticles: theory, modeling, and experiment // *J. Phys. Chem. C.* 2012. Vol. 116, № 19. P. 10723–10733.
16. Vaschenko S. V., Ramanenka A. A., Guzatov D. V., Stankevich V. V., Lunevich A. Y., Glukhov Y. F., Sveklo I. F., Gaponenko S. V. Plasmon-enhanced fluorescence of labeled biomolecules on top of a silver sol-gel film // *J. Nanophoton.* 2012. Vol. 6, № 1. P. 061710.
17. Романенко А. А., Ващенко С. В., Станкевич В. В., Луневич А. Я., Глухов Ю. Ф., Гапоненко С. В. Плазмонное усиление люминесценции конъюгатов изотиоцианата флуоресцеина и иммуноглобулина человека // *ЖПС.* 2014. Т. 81, № 2. С. 228–232.
18. Teramura Y., Iwata H. Label-free immunosensing for α -fetoprotein in human plasma using surface plasmon resonance // *Anal. Biochem.* 2007. Vol. 365, № 2. P. 201–207.
19. Arima Y. Surface Plasmon Resonance and Surface Plasmon Field-Enhanced Fluorescence Spectroscopy for Sensitive Detection of Tumor Markers // *Methods in Molecular Biology: Biosensors and Biodetection* : in 25 ch. New York, 2009. Vol. 503. Ch. 1. P. 3–20.
20. Chang Y. F., Chen R. C., Lee Y. J., Chao S. C., Su L. C., Li Y. C., Chou C. Localized surface plasmon coupled fluorescence fiber-optic biosensor for alpha-fetoprotein detection in human serum // *Biosens. Bioelectron.* 2009. Vol. 24, № 6. P. 1610–1614.
21. Murakami T., Arima Y., Toda M., Takiguchi H., Iwata H. Effect of dielectric spacer thickness on signal intensity of surface plasmon field-enhanced fluorescence spectroscopy // *Anal. Biochem.* 2012. Vol. 421, № 2. P. 632–639.
22. Tang L., Dong C., Ren J. Highly sensitive homogenous immunoassay of cancer biomarker using silver nanoparticles enhanced fluorescence correlation spectroscopy // *Talanta.* 2010. Vol. 81, № 4/5. P. 1560–1567.
23. Fang J., Zhong C., Mu R. The study of deposited silver particulate films by simple method for efficient SERS // *Chem. Phys. Lett.* 2005. Vol. 401, № 1/3. P. 271–275.
24. Nakamura N., Lim T. K., Jeong J. M., Matsunaga T. Flow immunoassay for detection of human chorionic gonadotrophin using a cation exchange resin packed capillary column // *Anal. Chim. Acta.* 2001. Vol. 439, № 1. P. 125–130.
25. Wang Z. B., Luk'yanchuk B. S., Guo W., Edwardson S. P., Whitehead D. J., Li L., Liu Z., Watkins K. G. The influences of particle number on hot spots in strongly coupled metal nanoparticles chain // *J. Chem. Phys.* 2008. Vol. 128, № 9. P. 094705.
26. Strekal N., Maskevich A., Maskevich S., Jardillier J. C., Nabiev I. Selective enhancement of Raman or fluorescence spectra of biomolecules using specifically annealed thick gold films // *Biopolymers (Biospectroscopy).* 2000. Vol. 57, № 6. P. 325–328.
27. Kulakovich O., Strekal N., Yaroshevich A., Maskevich S., Gaponenko S., Nabiev I., Woggon U., Artemyev M. Enhanced luminescence of CdSe quantum dots on gold colloids // *Nano Lett.* 2002. Vol. 2, № 12. P. 1449–1452.
28. Caruso F. Nanoengineering of particle surfaces // *Adv. Mater.* 2001. Vol. 13, № 1. P. 11–22.
29. Nooney R., Clifford A., LeGuevel X., Stranik O., McDonagh C., MacCraith B. D. Enhancing the analytical performance of immunoassays that employ metal-enhanced fluorescence // *Anal. Bioanal. Chem.* 2010. Vol. 396, № 3. P. 1127–1134.
30. Okuda K. Early recognition of hepatocellular carcinoma // *Hepatology.* 1986. Vol. 6, № 4. P. 729–738.

Поступила в редакцию 22.08.2014.

Светлана Валентиновна Ващенко – кандидат химических наук, доцент, заместитель декана химического факультета.

Сергей Васильевич Гапоненко – член-корреспондент НАН Беларуси, доктор физико-математических наук, профессор, заведующий лабораторией нанооптики Института физики им. Б. И. Степанова НАН Беларуси.

Ольга Сергеевна Кулакович – кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории нанооптики Института физики им. Б. И. Степанова НАН Беларуси.

Анатолий Антонович Минько – доктор физико-математических наук, профессор, заведующий кафедрой физической оптики.

Андрей Алексеевич Романенко – аспирант кафедры физической оптики. Научный руководитель – С. В. Гапоненко.